



PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of

Tohru TANAKA, *et al.*

Appln. No.: 09/445,963

Filed: December 16, 1999

Group Art Unit: 1642

Examiner: N. Davis

For: AGENT FOR DIAGNOSING AND TREATING MALIGNANT TUMORS

DECLARATION

Assistant Commissioner for Patents

Washington, D.C. 20231

Sir/Madam:

I, Eiichi Kobayashi, do declare and state that:

I graduated from the University of Tokyo, Faculty of Agriculture, Department in Agricultural Chemistry, having received a Master's Degree of Agriculture in March, 1992.

I understand the Japanese and English languages. Attachment A is a copy of Japanese Patent Application No. Hei-2-111747 (Kajiwara), and Attachment B is an accurate English translation made by me of Kajiwara.

I declare further that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

Date: March 27, 2002

Name: Eiichi Kobayashi

Eiichi Kobayashi

TECH CENTER 1600/2900

APR 11 2002

RECEIVED

13
4-300

⑫ 公開特許公報(A) 平2-111747

⑬ Int. Cl.⁵C 07 C 229/22
A 61 K 49/00
C 07 C 227/10

識別記号

庁内整理番号

A

6516-4H
7417-4C

⑭ 公開 平成2年(1990)4月24日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全9頁)

⑮ 発明の名称 炭素13標識5-アミノレブリン酸及びその誘導体の製造方法

⑯ 特 願 昭63-263877

⑰ 出 願 昭63(1988)10月21日

⑱ 発 明 者 梶 原 正 宏 埼玉県新座市馬場2-1-14
⑲ 出 願 人 新日鐵化学株式会社 東京都中央区銀座5丁目13番16号
⑳ 代 理 人 弁理士 成瀬 勝夫 外3名

明 細 書

1. 発明の名称

炭素13標識5-アミノレブリン酸及びその誘導体の製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) 1位及び/又は2位が炭素13で標識された酢酸ナトリウムを出発原料とし、この炭素13標識酢酸ナトリウムから誘導されるブロム酢酸エチル、メルドラム酸又はフタルグリシン化合物を中間体として5-アミノレブリン酸を合成することを特徴とする1、3、4又は5位の少くとも1つの炭素が炭素13で標識された5-アミノレブリン酸又はその誘導体の製造方法。

(2) 1位及び/又は2位が炭素13で標識された酢酸ナトリウムを出発原料とし、この炭素13標識酢酸ナトリウムから誘導されるブロム酢酸エチル、メルドラム酸又はフタルグリシン化合物を中間体として1、3、4又は5位の少くとも1つの炭素が炭素13で標識された炭素13標識5-アミノレブリン酸又はその塩を合成し、これを脱水酢素で縮合

させてポリホビリノーゲンを合成することを特徴とする少くとも2つの炭素が炭素13で標識されたポリホビリノーゲンの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

この発明は、炭素13で標識された5-アミノレブリン酸及びその誘導体の製造方法及びこれを原料とするヘム前駆体ポリホビリノーゲンの製造方法に関する。これらの化合物は、生合成や代謝の研究あるいは診断のために有用である。

〔従来の技術〕

高磁場FT-NMRの進歩により、炭素13で標識された化合物が有機化学や生化学における種々の問題の解決のために広く適用されるようになってきた。これは、高磁場FT-NMRを使用することにより、生合成経路等の研究において極めて重要な炭素13(¹³C)で標識された化合物の¹³C標識位置をこの¹³C標識化合物を分解することなく決定することができるからである。また、このような¹³C標識化合物のいくつかは既に市販され

てはいるが、非常に高価であるばかりでなく、その種類も限られている。

ところで、5-アミノレブリン酸(ALA)は、ヘム前駆体ポルホピリノーゲン(PBG)を経由してヘムやクロロフィルあるいはビタミンB₁₂を合成する際の中間体となり、また、除草剤としても有用であることが報告されている。そして、このALAについては、その5位の炭素が¹³Cで標識された化合物([5-¹³C]-ALA)が市販品として入手できるが、これは[2-¹³C]マロン酸エチルエステルあるいはエチル-4-オキソブチレートから合成されており、この方法が実験室的規模にのみ適した合成法であることから極めて高価である。

そこで、本発明者は、[2-¹³C]酢酸ナトリウムからプロモ酢酸エチルを経由して[2-¹³C]ALAを合成する方法を完成し報告した(J. A. C. S., 96:26, p8069-8080(Dec. 25, 1974)。この方法は、出発物質として¹³Cで標識された酢酸ナトリウムを使用するのであり、この¹³C標識酢酸ナトリウムが固体であることからその取扱が容易であ

って、大量に使用されているために比較的安価であるという利点がある。

しかしながら、この¹³C標識酢酸ナトリウムを出発物質として¹³Cで標識されたALAを合成する方法については、この[2-¹³C]ALAを合成する方法以外には報告されていない。

〔発明が解決しようとする課題〕

そこで、本発明者は、¹³C標識酢酸ナトリウムを出発原料としてALAの任意の位置が¹³Cで標識された¹³C標識ALAを合成することができれば、生化学の研究の発展に役立つところが大きいという観点から鋭意研究を重ねた結果、1位及び/又は2位が¹³Cで標識された酢酸ナトリウムを使用して目的を達成し得ることを見出し、本発明に到達した。

従って、本発明の目的は、1位及び/又は2位が¹³Cで標識された酢酸ナトリウムを出発原料として、任意の位置が¹³Cで標識されたALAを製造する方法を提供することにある。

〔課題を解決するための手段〕

すなわち、本発明は、1位及び/又は2位が炭素13で標識された酢酸ナトリウムを出発原料とし、この炭素13標識酢酸ナトリウムから誘導されるプロモ酢酸エチル、メルドラム酸又はフタルグリシン化合物を中間体として5-アミノレブリン酸を合成する1、3、4又は5位の少くとも1つの炭素が炭素13で標識された5-アミノレブリン酸又はその誘導体の製造方法である。また、本発明は、このようにして合成された1、3、4又は5位の少くとも1つの炭素が炭素13で標識された5-アミノレブリン酸を使用し、これを脱水酵素で縮合させてポルホピリノーゲンを合成する少くとも2つの炭素が炭素13で標識されたポルホピリノーゲンの製造方法である。

以下、本発明の製造方法を第1図及び第2図に示す製造工程に基いて詳細に説明する。

第1図は¹³C標識ALAの製造方法を示すもので、例えば[1-¹³C]ALA(1a)は次のようにして合成される。

すなわち、[1-¹³C]酢酸ナトリウム(2a)を臭素

と臭化ベンゾイルで処理し、これに無水エタノールを加えて反応させると[1-¹³C]プロモ酢酸エチル(3a)が得られる。また、この[1-¹³C]プロモ酢酸エチル(3a)は[1-¹³C]酢酸ナトリウム(2a)を酸分解して得られる[1-¹³C]酢酸からも高収率で得ることができる。

この[1-¹³C]プロモ酢酸エチル(3a)は、1,2-ジメトキシエタン中で水酸化ナトリウムを使用し、至温で数日間エチルフルイミドアセトアセテート(11)と反応させると、高収率で[1-¹³C]エチル-3-エトキシカルボニル-5-フルイミドレブリエート(12a)を与える。

このジエステル(12a)は、水酢酸と塩化酸の1:1混合物で半日程度処理することにより、目的の[1-¹³C]ALA(1a)を高収率で与える。

また、上記と同様にして[2-¹³C]酢酸ナトリウム(2b)から[2-¹³C]プロモ酢酸エチル(3b)を合成し、上記の[1-¹³C]プロモ酢酸エチル(3a)をこの[2-¹³C]プロモ酢酸エチル(3b)に置換えて上記と同様の反応を行うことにより、[2-¹³C]ALA

(1b)を高収率で合成することができる。

さらに、 $[4-^{13}\text{C}]\text{ALA}$ (1d)と $[5-^{13}\text{C}]\text{ALA}$ (1e)の合成は以下の方法で行うことができる。

すなわち、無水フタル酸(8)と上記 $[1-^{13}\text{C}]$ プロモ酢酸エチル(3a)から合成される $[1-^{13}\text{C}]$ グリシン(9a)とを 165°C で15分間程度の条件で反応させることにより $[1-^{13}\text{C}]\text{N-フタロイルグリシン}$ (6a)を合成する。なお、この $[1-^{13}\text{C}]\text{N-フタロイルグリシン}$ (6a)は、フタルイミドカリウム(4)と $[1-^{13}\text{C}]$ プロモ酢酸エチル(3a)との反応によっても合成される。さらに、このようにして合成された $[1-^{13}\text{C}]\text{N-フタロイルグリシン}$ (6a)を塩化チオニルで処理すれば、容易に $[1-^{13}\text{C}]$ フタルイミドアセチルクロライド(7a)が得られる。

そして、この $[1-^{13}\text{C}]$ フタルイミドアセチルクロライド(7a)をジクロロメタンとピリジンの混合溶媒中で2,2-ジメチル-4,6-ジオキソ-1,3-ジオン(メルドラム酸、10)と反応させ、乾燥エタノールで処理することにより、高収率で β -ケトエステル(11b)が得られる。なお、上記メルドラム

酸(10)は、公知の方法により、酢酸ナトリウム(2)からプロモ酢酸(13)を経る合成経路により容易に合成される。

さらに、この β -ケトエステル(11b)をプロモ酢酸エチル(3)と水素化ナトリウムで処理した後、酸で加水分解することにより、目的の $[4-^{13}\text{C}]\text{ALA}$ (1d)が得られる。

同様に、 $[5-^{13}\text{C}]\text{ALA}$ (1e)も $[2-^{13}\text{C}]$ フタルイミドアセチルクロライド(7b)を経由する合成経路で上記と同様に合成される。

$[3-^{13}\text{C}]\text{ALA}$ (1c)も $[2-^{13}\text{C}]$ 酢酸ナトリウム(2b)から $[2-^{13}\text{C}]$ プロモ酢酸(13a)を経て合成される $[2-^{13}\text{C}]$ メルドラム酸(10a)を経由する合成経路で上記と同様に合成される。

以上、いずれか1つの炭素が ^{13}C で標識されたALAの製造方法を説明したが、2つ以上の炭素が ^{13}C で標識されたALAも上記と同様な方法で製造することができる。例えば、 $[1,2-^{13}\text{C}]\text{ALA}$ (1f)は $[1,2-^{13}\text{C}]$ 酢酸ナトリウム(2c)から $[1,2-^{13}\text{C}]$ プロモ酢酸エチル(3c)を経て化合物

(12)を経由して合成される。

また、 $[4,5-^{13}\text{C}]\text{ALA}$ (1g)は上記 $[1,2-^{13}\text{C}]$ 酢酸ナトリウム(2c)から $[1,2-^{13}\text{C}]$ プロモ酢酸エチル(3c)あるいは $[1,2-^{13}\text{C}]$ グリシン(9c)を合成し、化合物(7)、(11)及び(12)を経由して合成される。

さらに、 $[3,4,5-^{13}\text{C}]\text{ALA}$ (1h)は、上記 $[1,2-^{13}\text{C}]$ フタルイミドアセチルクロライド(7)と $[2-^{13}\text{C}]$ メルドラム酸(10a)から化合物(11)及び(12)を経由して合成される。

また、 ^{13}C で標識されたALAの誘導体としては種々のものがあるが、代表的には塩酸塩、ナトリウム塩等の塩、メチルエステル等のエステル、酸塩化物等の酸ハライド、アミド等が挙げられ、これらは公知の方法により容易に製造することができる。

次に、第2図は、ALAからポリホピリノーゲン(PBG)を製造する製造工程を示すもので、第1図に示す方法で得られた1つの炭素が ^{13}C で標識されたALAを使用し、2つの炭素が ^{13}C で標識

された ^{13}C 標識PBGの合成例を示すものである。

例えば、第2図に示すように、 $[5-^{13}\text{C}]\text{ALA}$ (1e)をALA脱水酵素(ALA-D又はPBG synthase)で縮合させると、ピロール環の2位の炭素とアミノ基に隣接する炭素の2つが ^{13}C で標識されたPBG(20e)が得られる。

また、第2図に示すように、上記 $[5-^{13}\text{C}]\text{ALA}$ (1e)に代えて $[3-^{13}\text{C}]\text{ALA}$ (1c)を使用すると、ピロール環の4位の炭素とピロール環の3位に結合する炭素の2つが ^{13}C で標識されたPBG(20c)が得られる。

同様に、他の位置の炭素が ^{13}C で標識されたALA(1a)、(1b)又は(1d)を使用することにより、それぞれ対応する部位の炭素が ^{13}C で標識されたPBGが得られる。また、2つの炭素が ^{13}C で標識されたALAを使用すれば、4つの炭素が ^{13}C で標識されたPBGが得られ、さらに、3つの炭素が ^{13}C で標識されたALAを使用すれば、6つの炭素が ^{13}C で標識されたPBGが得られる。

このようにして製造されたPBGは、例えば発光素子の診断薬等として有用である。

[実施例]

以下、実施例及び参考例に基いて、本発明方法を具体的に説明する。

実施例 1

1,2-ジメトキシエタン 7 ml 中にエチルフタリイミドアセトアセテート(11) 8.47 g (3.31 mmol) を溶解し、この溶液を1,2-ジメトキシエタン 7 ml と水系化ナトリウム(パラフィン中60%) 15.4 g (3.85 mmol) の懸濁液中に添加し、アルゴン雰囲気下に室温で1時間攪拌した。その後、この懸濁液中に乾燥1,2-ジメトキシエタン 5 ml 中に $[1-^{13}\text{C}]$ プロモ酢酸エチル(3a) 6.47 g (3.85 mmol) を溶解して得られた溶液を加え、室温で1日間攪拌し、得られた反応混合物を1N-塩酸で中和し、エーテルで抽出した。得られた有機相を飽和食塩水で洗浄し、乾燥剤で乾燥し、溶媒を留去して無色針状結晶の $[1-^{13}\text{C}]$ エチル-3-エトキシカルボニル-5-フタリイミドレプリネート(1

ノレプリン酸ハイドロクロライド(1a) 1.25 g (収率71%)を得た。

このものの融点、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 及びIRを測定した結果を以下に示す。

融点: 146~149 °C

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): 2.71, 2.90, 4.13 ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): 177.4 ($1-^{13}\text{C}$) ppm

IR(KBr): 3430 cm^{-1}

実施例 2

$[1-^{13}\text{C}]$ グリシン(9a) (99% atom ^{13}C) 1.0 g (13.1 mmol) と無水フタル酸 1.95 g (13.1 mmol) の混合物をそれが融解しそして再び固化するまで150~170 °Cで10分間加熱し、得られた生成物を水で再結晶し、乾燥して無色針状結晶の $[1-^{13}\text{C}]$ フタリイミド酢酸(6a) 2.64 g (収率97.5%)を得た。

このものの融点、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、IR及びMSを測定した結果を以下に示す。

融点: 191~194 °C

2a) 1.25 g (収率89.7%)を得た。

このものの融点、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、IR及びMSを測定した結果を以下に示す。

融点: 71~74 °C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1.25 & 1.33, 2.95, 4.18 & 4.29, 4.19, 4.83, 7.83 ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 170.6 ($1-^{13}\text{C}$) ppm

IR(KBr): 1723 cm^{-1}

MS(m/z): 362 (H^+)

次に、このようにして得られたジエステル(12a)を氷酢酸-濃塩酸(1:1)混合液15 ml 中に溶解し、アルゴン雰囲気中で1日間加熱還流した。反応終了後、反応混合物中の溶媒を留去し、得られた茶色の残渣粉末を水20 ml 中に溶解し、過剰の塩化水素を留去した。得られた残渣物を再び水40 ml 中に溶解し、フタル酸を除去するために酢酸エチル150 ml で3回洗浄した。このようにして得られた水相を濃縮し、残渣物をイオン交換樹脂で精製し、凍結乾燥し、さらにエタノール/エーテル溶媒で再結晶し、無色針状結晶の $[1-^{13}\text{C}]$ 5-アミ

$^1\text{H-NMR}$ (アセトン- d_6): 4.40, 7.82 ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (アセトン- d_6): 168.93 ($1-^{13}\text{C}$) ppm

IR(KBr): 1720, 1775 cm^{-1}

MS(m/z): 206 (H^+)

このようにして得られた $[1-^{13}\text{C}]$ フタリイミド酢酸(6a) 2.64 g (12.8 mmol) を塩化チオニル 12 ml (61.8 mmol) 中に溶解し、60 °Cで4時間加熱還流し、その後過剰の塩化チオニルを除去した。得られた淡黄色固体をベンゼン中に溶解し、このベンゼンを留去することによって塩化チオニルを完全に除去し、淡黄色結晶の $[1-^{13}\text{C}]$ フタリイミドアセチルクロライド(7a) 2.91 g (収率99.2%)を得た。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 測定結果は4.80, 7.78 ppmであった。

次に、ジクロロメタン1 ml とピリジン2 ml の混合溶媒中にメルドラム酸(20) 1.95 g (13.5 mmol) を溶解し、この溶液中に0 °Cでアルゴン雰囲気下に1.5時間かけて上記 $[1-^{13}\text{C}]$ フタリイミドアセチルクロライド(7a) 2.91 g (13.0 mmol)

1)のジクロロメタン2ml溶液を滴下し、さらに攪拌下に室温で1.5時間反応させた。反応終了後、得られた反応生成物を6N-塩酸と飽和食塩水で洗浄し、乾燥剤で乾燥し、溶媒を留去した。得られた粘性オイルを無水エタノール100ml中で3時間遠流し、その後過剰のエタノールを留去した。残渣物をジクロロメタン100mlで希釈し、飽和重曹水と飽和食塩水で洗浄し、乾燥剤で乾燥した後溶媒を留去し、得られた粗生成物をエタノールで再結晶し、無色針状結晶の[3-¹³C]エチルフタルイミドアセトアセテート(11b)2.33g(収率65.4%)を得た。

このものの融点、¹H-NMR、¹³C-NMR、IR及びMSを測定した結果を以下に示す。

融点: 109~111℃

¹H-NMR(CDCI₃): 1.29, 3.50, 4.22, 4.62, 7.77 ppm

¹³C-NMR(CDCI₃): 194.79 (3-¹³C) ppm

IR(KBr): 1722, 1745 cm⁻¹

MS(m/z): 276(H⁺)

合溶液20ml中に溶解し、アルゴン雰囲気中120℃で一晩加熱遠流した。反応終了後、反応混合物中の溶媒を留去し、得られた茶色の残渣を水50ml中に溶解し、フタル酸を除去するために酢酸エチル150mlで3回洗浄した。このようにして得られた水層を濃縮し、残渣物をイオン交換樹脂で精製し、凍結乾燥し、さらにエタノール/エーテル溶媒で再結晶し、無色針状結晶の[4-¹³C]5-アミノレブリン酸ハイドロクロライド(1d)391.0mg(収率27.5%)を得た。

このものの融点、¹H-NMR、¹³C-NMR及びIRを測定した結果を以下に示す。

融点: 146~149℃

¹H-NMR(D₂O): 2.71, 2.90, 4.13 ppm

¹³C-NMR(D₂O): 206.3 (1-¹³C) ppm

IR(KBr): 3430 cm⁻¹

実施例3

[2-¹³C]プロモ酢酸(2b)1.473g(10.6mmol)の水溶液1.5mlに炭酸ナトリウム0.58g(5.4mmol)を加えた後、シアン化ナトリウム

このようにして得られた上記[3-¹³C]エチルフタルイミドアセトアセテート(11b)2.33g(8.43mmol)を1,2-ジメトキシエタン20ml中に溶解し、得られた溶液を水素化ナトリウム(パラフィン中60%)420.0mg(10.5mmol)の1,2-ジメトキシメタン5ml懸濁液中に攪拌下0℃で添加し、その後アルゴン雰囲気下に室温で1時間攪拌した。さらに、得られたこの懸濁液中にプロモ酢酸エチル(3)1.76g(10.5mmol)の1,2-ジメトキシエタン5ml溶液を添加し、室温で攪拌下に2日間反応させた。反応終了後、得られた反応混合物を1N-塩酸で中和し、エーテルで抽出し、オレンジ色のエーテル層を飽和食塩水で洗浄し、乾燥剤で乾燥して溶媒を留去し、粗生成物の[4-¹³C]エチル-3-エトキシカルボニル-5-フタルイミドレプリネート(12d)を得た。この粗生成物(12d)は精製することなくそのまま次の反応に使用した。

上記粗生成物(12d)を氷酢酸-濃塩酸(1:1)混

0.60g(12.3mmol)の水溶液1.5mlを氷冷下に滴下し、湯浴中で40分間反応させた。その後、一旦室温に戻した後、水酸化ナトリウム0.5gを加え、湯浴中で2時間加熱した。さらに、この溶液に塩化カルシウム0.8gの水溶液を加えた後、室温で2日間反応させた。反応終了後、生成物を遠心分離し、水洗、乾燥した後、エーテルを加え、さらに12N-塩酸1.0mlを加えた後、エーテル抽出をした。得られたエーテル層を乾燥後、溶媒を留去し、粗生成物の[2-¹³C]マロン酸0.444g(収率40.3%)を得た。

次に、上記[2-¹³C]マロン酸を無水酢酸0.5mlと濃硫酸0.05mlの混合液中に懸濁させ、氷冷下に無水アセトン0.4mlを滴下し、室温で1時間反応させた。反応終了後、析出した結晶を遠心分離し、得られた粗結晶を0.5N-硫酸2mlで洗浄し、水洗してアセトン/エーテル/n-ヘキサンの混合溶媒で再結晶し、無色針状結晶の[2-¹³C]メルドラム酸(10a)0.311g(収率50.6%)を得た。

このものの融点、¹H-NMR、¹³C-NMR

及びIRを測定した結果を以下に示す。

融点: 92~95℃

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 3.62, 1.79 ppm

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 36.15 ($2\text{-}^{13}\text{C}$) ppm

IR: 1790, 1750 cm^{-1}

次に、上記 $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ メルドラム酸(10a)を使用し、上記 $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{ALA} \cdot \text{HCl}$ (1a)と同様にして $[3\text{-}^{13}\text{C}]\text{ALA} \cdot \text{HCl}$ を合成した。

中間生成物及び $[3\text{-}^{13}\text{C}]\text{ALA} \cdot \text{HCl}$ について融点、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、IR及びMSを測定した。結果を以下に示す。

$[2\text{-}^{13}\text{C}]$ エチルフタルイミドアセトアセート(11a)

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 1.31, 3.58, 4.24, 4.76, 7.88
& 7.75 ppm

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 46.90 ($2\text{-}^{13}\text{C}$) ppm

$[3\text{-}^{13}\text{C}]$ エチル-3-エトキシカルボニル-5-フタルイミドレブリンネート(12c)

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 1.26, 1.35, 2.94, 3.02, 4.15, 4.16, 4.28, 4.73, 4.94, 7.88

丸底フラスコ中に安息香酸 1.1 g (9.0 mmol) と $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ 酢酸ナトリウム(2b) 820 mg (10 mmol) とを仕込み、さらに臭化ベンゾイル 7.5 ml (64 mmol) を加え、120℃で5時間加熱下に反応させた。生成したアセチルブロマイドを受器に蒸留し、この受器中に-78℃で5時間乾燥臭素 2.6 ml (50 mmol) を導入した。この臭素導入終了後、反応混合物を室温で数分間攪拌し、さらに5時間還流した。反応混合物を室温まで冷却した後、過剰の臭素を窒素ガスブローによって除去し、次いで-78℃で10分間かけて乾燥エタノール 2.4 ml (40 mmol) を加え、室温で12時間攪拌下に反応させた。反応生成物を飽和酢酸水 10 ml で中和し、エーテル 30 ml で3回抽出し、得られたエーテル層(90 ml) を10 ml の水で2回洗浄し、乾燥剤で乾燥し、エーテルを留去して淡黄色オイル状の $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ プロム酢酸エチル(3b) 991 mg (収率59.3%)を得た。

このものの $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 及びIRを測定した。結果を以下に示す。

& 7.74 ppm

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 52.05 ($3\text{-}^{13}\text{C}$) ppm

$[3\text{-}^{13}\text{C}]\text{ALA} \cdot \text{HCl}$ (1c) (収率1.285

g、化合物(10a)からの収率27.3%)

融点: 147℃

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: 2.70, 2.89, 2.89, 4.12 ppm

$^{13}\text{C-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: 36.8 ($3\text{-}^{13}\text{C}$) ppm

IR(KBr): 3430 cm^{-1}

実施例4

$[2\text{-}^{13}\text{C}]$ グリシンを使用した以外は実施例2と同様にして $[5\text{-}^{13}\text{C}]\text{ALA} \cdot \text{HCl}$ を得た。このものの $^{13}\text{C-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ は 47.8 ppm であった。

なお、 $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ プロム酢酸エチル(3b)を使用した以外は実施例1と同様にして $[2\text{-}^{13}\text{C}]\text{ALA} \cdot \text{HCl}$ (1b)を得た。このものの融点は148℃、 $^{13}\text{C-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ は 31.6 ppm、IR(KBr) は 3430 cm^{-1} であった。

参考例1: $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ プロム酢酸エチル(3b)の合成

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 1.35, 3.15, 4.20 ppm

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 25.9 ($2\text{-}^{13}\text{C}$) ppm

IR(KBr): 1735 cm^{-1}

参考例2: $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ プロム酢酸エチル(3a)の合成

$[1\text{-}^{13}\text{C}]$ 酢酸ナトリウム(2a)を使用し、上記参考例1と同様にして調製した。得られた $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ プロム酢酸エチル(3a)の $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 及びIRを測定した。結果を以下に示す。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 1.35, 3.77, 4.20 ppm

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 167.2 ($1\text{-}^{13}\text{C}$) ppm

IR: 1735 cm^{-1}

参考例3: $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ エチルフタルイミドアセート(5b)の合成

ジメチルホルムアミド 7.6 ml 中で $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ プロム酢酸エチル(3b) 939 mg (5.59 mmol) とフタルイミドカリウム(4) 1.15 g (6.22 mmol) とを3時間還流下に反応させ、得られた反応混合物を15 ml のクロロホルムで4回抽出し、クロロホ

ルム酸 (60 ml) を 0.1N-水酸化ナトリウム溶液 10 ml で中和し、15 ml の水で 2 回洗浄し、乾燥剤で乾燥し、溶媒を留去して得られた粗生成物をエタノールで再結晶し、無色針状結晶の [2-¹³C] エチルフタルイミドアセテート (5b) 975 mg (収率 75.0%) を得た。得られた [2-¹³C] エチルフタルイミドアセテート (5b) の ¹H-NMR、¹³C-NMR、IR 及び MS を測定した。結果を以下に示す。

¹H-NMR(CDCl₃): 1.25、3.72、4.29、7.78 ppm

¹³C-NMR(CDCl₃): 38.98 (2-¹³C) ppm

IR(KBr): 1776、1732、1720 cm⁻¹

HS(m/z): 234(H⁺)

参考例 4: [2-¹³C] グリシン (9b) の合成

上記参考例 3 で得られた [2-¹³C] エチルフタルイミドアセテート (5b) 250 mg (1.07 mmol) を 6N-塩酸 6.25 ml 中に溶解し、5 時間還流下に反応させた。反応混合物を同量の水で希釈し、10 ml の酢酸エチルで 3 回洗浄し、水層を留去して得られた残渣物をイオン交換樹脂で精製し、白色粉末状の [2-¹³C] グリシン (9b) 108 mg (収率 90

.0%) を得た。得られた [2-¹³C] グリシン (9b) の ¹H-NMR、¹³C-NMR、IR 及び MS を測定した。結果を以下に示す。

¹H-NMR(D₂O): 3.70 ppm

¹³C-NMR(D₂O): 49.93 (s, ¹³C) ppm

IR(KBr): 3100、1600 cm⁻¹

HS(m/z): 76(H⁺)

実施例 5

5 mm NMR チューブの中に内部標準としてジオキサンを含有する重水中に ¹³C 標識 ALA を溶解した溶液 0.1 ml を仕込み、この ¹³C 標識 ALA 溶液の中に 0.5N-塩酸ナトリウム緩衝液 0.05 ml と同量の硫酸亜鉛 (1mM)-ジチオトレイトール (100 mM) とを添加し、さらに 5-アミノレブリン酸脱水酵素 0.3 ml を加えて急速に攪拌し、この混合物を培養して酵素反応を行った。

ここで使用した 5-アミノレブリン酸脱水酵素は、ヒト末梢血液 (human peripheral blood) から単離されたもので、生成酵素は Granick Mauzerall 法

で分析したところ 12.6 units/mg の比活性を有するものであった。

この酵素反応においては、JEOL-GX-400 スペクトロメーターを使用し、100.4 MHz で 5 mm NMR チューブ内の塩酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) におけるプロトンデカップリング ¹³C-NMR スペクトルが測定された。これらのスペクトルは、パルス幅 5.5 μs (45° パルス) とスペクトル幅 25000 Hz を使用して 20°C で測定された。重水の内部ロックが用いられ、そしてケミカルシフトはジオキサン (δ 1.4 ppm) を内部基準として測定した。

¹³C 標識 ALA として [5-¹³C] ALA (1e) を使用したとき、ピロール環の 2 位の炭素とアミノ基に隣接する炭素の 2 つが ¹³C で標識された PBG (20e) が生成する。これは、第 2 図 (a)、(b) に示すように、[5-¹³C] ALA のシグナル (δ = 47.8 ppm) が経時的に減少し、それにつれて PBG に帰属する 2 つのシグナル (δ = 35.5 ppm 及び δ = 117.2 ppm) が増加していくことで確認された。

また、[3-¹³C] ALA (1c) を使用したとき、ピロール環の 3 位の炭素とピロール環の 4 位に結合する炭素の 2 つが ¹³C で標識された PBG (20c) が生成していることが上記と同様に第 3 図 (a)、(b) のシグナルの経時的変化によって確認された。

【発明の効果】

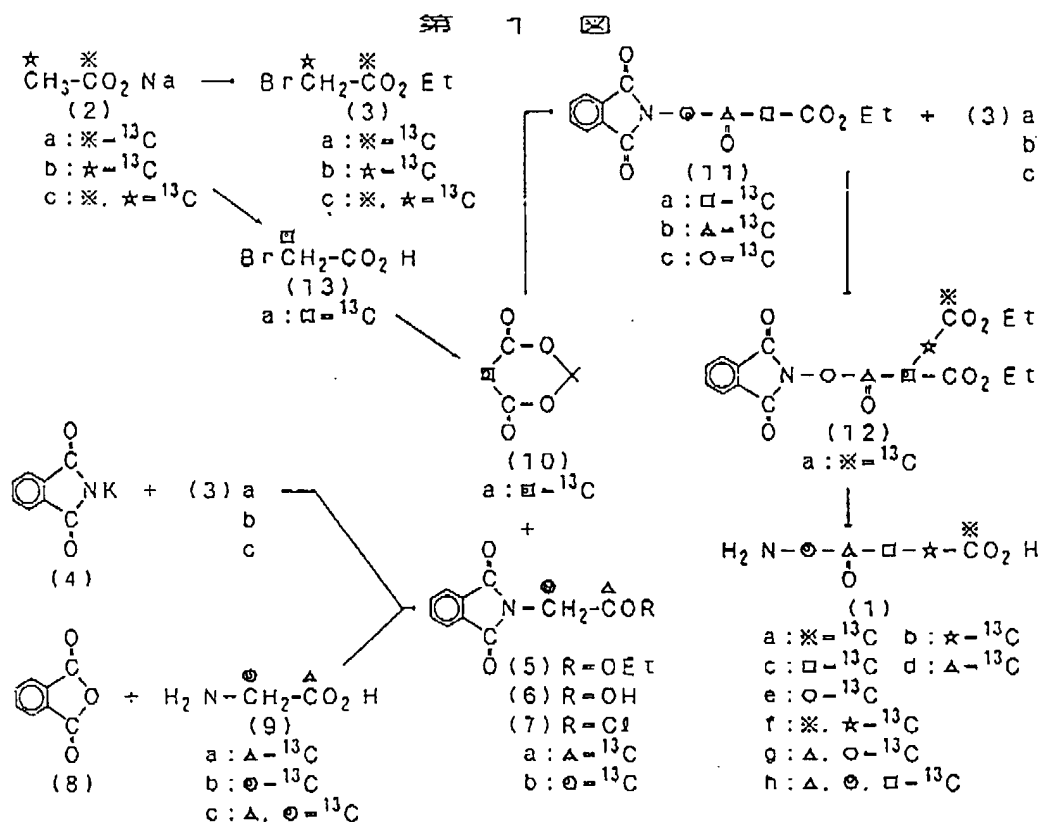
本発明によれば、1 位及び/又は 2 位が ¹³C で標識された酢酸ナトリウムを出発原料として、5-アミノレブリン酸の少なくとも 1 つの任意の位置が ¹³C で標識された 5-アミノレブリン酸及びその誘導体を製造することができ、また、この ¹³C 標識 5-アミノレブリン酸を使用して少なくとも 2 つの炭素が ¹³C で標識された種々のホルホビリノーゲンを製造することができる。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は 1 位及び/又は 2 位が ¹³C で標識された酢酸ナトリウムから任意の位置が ¹³C で標識された 5-アミノレブリン酸を合成する合成経路を示すチャート、第 2 図 (a)、(b) は [5-¹³C] 5-アミ

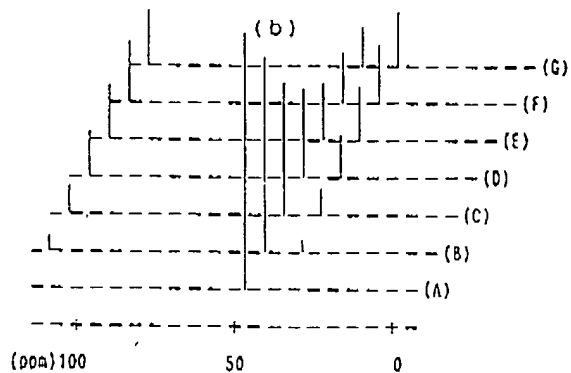
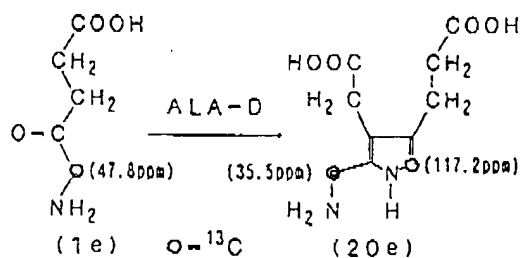
ノレブリン酸から ^{13}C 標置ボルホピリノーゲンを合成する合成経路を示すチャートとその時の経時変化を示す ^{13}C -NMRスペクトル、第3図(a)、(b)は $[3-^{13}\text{C}]5$ -アミノレブリン酸から ^{13}C 標置ボルホピリノーゲンを合成する合成経路を示すチャートとその時の経時変化を示す ^{13}C -NMRスペクトルである。

特許出願人 新日薬化学株式会社
代理人 分理士 成瀬 勝夫
(外3名)



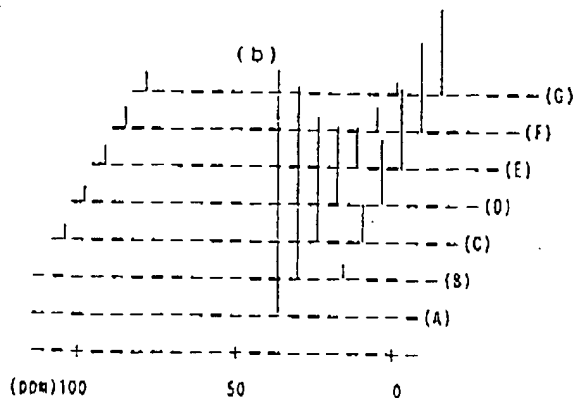
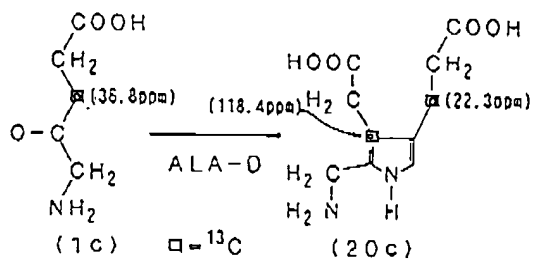
第 2 図

(a)



第 3 図

(a)



B

SPECIFICATION

1. Title of the Invention

METHOD FOR PRODUCING CARBON-13-LABELED
5-AMINOLEVULINIC ACID AND DERIVATIVES THEREOF

2. Claims

(1) A method for producing 5-aminolevulinic acid in which at least one carbon at the 1-, 3-, 4- or 5-position is labeled with carbon-13, or a derivative thereof, characterized in that sodium acetate labeled with carbon-13 at the 1- and/or 2-position is used as the starting material, and 5-aminolevulinic acid is synthesized using ethyl bromoacetate, Meldrum's acid or a phthalglycine compound derived from the carbon-13-labeled sodium acetate as an intermediate.

(2) A method for producing porphobilinogen in which at least two carbons are labeled with carbon-13, characterized in that sodium acetate labeled with carbon-13 at the 1- and/or 2-position is used as the starting material, 5-aminolevulinic acid or a salt thereof in which at least one carbon at the 1-, 3-, 4- or 5-position is labeled with carbon-13 is synthesized using ethyl bromoacetate, Meldrum's acid or a phthalglycine compound derived from the carbon-13-labeled sodium acetate as an intermediate, and porphobilinogen is synthesized by condensing this using a dehydrogenase.

3. Detailed Description of the Invention

[Industrial Field of Application]

This invention relates to a method for producing 5-aminolevulinic acid and derivatives thereof labeled with carbon-13 and a method for producing a heme precursor porphobilinogen using this as a material. These compounds are useful for studies on biosynthesis and metabolism or diagnoses.

[Prior Art]

With the advance in the high magnetic field FT-NMR techniques, compounds labeled with carbon-13 have been applied broadly to the resolution of various problems in organic chemistry and biochemistry. This is because

the carbon-13 (^{13}C)-labeled position of a compound labeled with ^{13}C which is markedly important in carrying out studies on biosynthetic pathway and the like can be determined without degrading the ^{13}C -labeled compound by the use of the high magnetic field FT-NMR. Also, though some of such ^{13}C -labeled compounds are already on the market, not only they are considerably expensive but also their kinds are limited.

Also, it has been reported that 5-aminolevulinic acid (ALA) becomes an intermediate in synthesizing a heme, chlorophyll or vitamin B_{12} via a heme precursor porphobilinogen (PBG) and is also useful as a weed killer. Regarding the ALA, a compound in which its 5-position carbon is labeled with ^{13}C ($[5\text{-}^{13}\text{C}]\text{-ALA}$) is commercially available but considerably expensive, because this is synthesized from $[2\text{-}^{13}\text{C}]\text{malonic acid ethyl ester}$ or $\text{ethyl 4-oxobutyrate}$ and this method is a synthesis method suited only for a laboratory scale.

Accordingly, the present inventors have completed and reported a method for synthesizing $[2\text{-}^{13}\text{C}]\text{ALA}$ from sodium $[2\text{-}^{13}\text{C}]\text{acetate}$ via $\text{ethyl bromoacetate}$ (*J.A.C.S.*, 96: 26, pp. 8069-8080 (Dec. 25, 1974). Since this method uses sodium acetate labeled with ^{13}C as the starting material, it has advantages in that the ^{13}C -labeled sodium acetate is easy to handle because it is solid and is relatively inexpensive because it is used in large scale.

However, regarding the method for synthesizing ALA labeled with ^{13}C using the ^{13}C -labeled sodium acetate as the starting material, nothing has been reported except for this $[2\text{-}^{13}\text{C}]\text{ALA}$ synthesizing method.

[Problems to be solved by the Invention]

Thus, the inventors have conducted intensive studies from the viewpoint that success in synthesizing ^{13}C -labeled ALA in which an optional position of ALA is labeled with ^{13}C from ^{13}C -labeled sodium acetate as the starting material will greatly contribute to the development of biochemical studies, and found as a result that this object can be achieved by the use of sodium acetate in which its 1- and/or 2-position is labeled with ^{13}C , thus resulting in the accomplishment of the invention.

Accordingly, the object of the invention is to provide a method for producing ALA in which its optional position is labeled with ^{13}C , using sodium acetate whose 1- and/or 2-position is labeled with ^{13}C as the starting material.

[Means for Solving the Problems]

That is, the invention is a method for producing 5-aminolevulinic acid in which at least one carbon at the 1-, 3-, 4- or 5-position is labeled with carbon-13, or a derivative thereof, using sodium acetate labeled with carbon-13 at the 1- and/or 2-position as the starting material, and synthesizing 5-aminolevulinic acid using ethyl bromoacetate, Meldrum's acid or a phthalglycine compound derived from the carbon-13-labeled sodium acetate as an intermediate. Also, the invention is a method for producing porphobilinogen in which at least two carbons are labeled with carbon-13, using the thus synthesized 5-aminolevulinic acid having at least one carbon at the 1-, 3-, 4- or 5-position labeled with carbon-13, and synthesizing porphobilinogen by condensing this using a dehydrogenase.

The production methods of the invention are described below in detail based on the production steps shown in Figs. 1 and 2.

Fig. 1 shows a method for producing ^{13}C -labeled ALA and, e.g., $[1-^{13}\text{C}]\text{ALA}$ (1a) is synthesized in the following manner.

That is, ethyl $[1-^{13}\text{C}]\text{bromoacetate}$ (3a) is obtained when sodium $[1-^{13}\text{C}]\text{acetate}$ (2a) is treated with bromine and benzoyl bromide and then allowed to react with absolute ethanol. This ethyl $[1-^{13}\text{C}]\text{bromoacetate}$ (3a) can also be obtained with a high yield from $[1-^{13}\text{C}]\text{acetic acid}$ prepared by subjecting the sodium $[1-^{13}\text{C}]\text{acetate}$ (2a) to acid decomposition.

This ethyl $[1-^{13}\text{C}]\text{bromoacetate}$ (3a) gives $[1-^{13}\text{C}]\text{ethyl 3-ethoxycarbonyl-5-phthalimidolevulinate}$ (12a) with a high yield when it is allowed to react with ethylphthalimide acetoacetate (11) at room temperature for several days in 1,2-dimethoxyethane using sodium hydroxide.

This diester (12a) gives the $[1-^{13}\text{C}]\text{ALA}$ (1a) of interest with a high yield when it is treated with a 1:1 mixture of glacial acetic acid and concentrated hydrochloric acid for about half a day.

Also, $[2-^{13}\text{C}]\text{ALA}$ (1b) can be synthesized with a high yield by synthesizing ethyl $[2-^{13}\text{C}]\text{bromoacetate}$ (3b) from sodium $[2-^{13}\text{C}]\text{acetate}$ (2b) in the same manner and carrying out the same reaction by replacing the ethyl $[1-^{13}\text{C}]\text{bromoacetate}$ (3a) by this ethyl $[2-^{13}\text{C}]\text{bromoacetate}$ (3b).

In addition, synthesis of $[4-^{13}\text{C}]\text{ALA}$ (1d) and $[5-^{13}\text{C}]\text{ALA}$ (1e) can be carried out by the following method.

That is, [1-¹³C]N-phthaloylglycine (6a) is synthesized by allowing phthalic anhydride (8) to react with [1-¹³C]glycine (9a) synthesized from the ethyl [1-¹³C]bromoacetate (3a) at 165°C for about 15 minutes. Also, the [1-¹³C]N-phthaloylglycine (6a) can also be synthesized the reaction of potassium phthalimide (4) with ethyl [1-¹³C]bromoacetate (3a). Then, [1-¹³C]phthalimidoacetyl chloride (7a) is easily obtained by treating the thus synthesized [1-¹³C]N-phthaloylglycine (6a) with thionyl chloride.

Next, the β-keto ester (11b) is obtained with a high yield by allowing this [1-¹³C]phthalimidoacetyl chloride (7a) to react with 2,2-dimethyl-4,6-dioxo-1,3-diol (Meldrum's acid, 10) in a mixed solvent of dichloromethane and pyridine and then treating with dry ethanol. Also, the Meldrum's acid (10) can be easily synthesized through a synthesis pathway of from sodium acetate (2) via bromoacetic acid (13) by a known method.

Thereafter, the [4-¹³C]ALA (1d) of interest is obtained by treating the β-keto ester (11b) with ethyl bromoacetate (3) and sodium hydride and then hydrolyzing with an acid.

Also, [5-¹³C]ALA (1e) is synthesized in the same manner by a synthesis pathway via [2-¹³C]phthalimidoacetyl chloride (7b).

The [3-¹³C]ALA (1c) is also synthesized in the same manner through a synthesis pathway by way of [2-¹³C]Meldrum's acid (10a) synthesized from sodium [2-¹³C]acetate (2b) via [2-¹³C]bromoacetic acid (13a).

Though production method of ALA in which any one of its carbons was labeled with ¹³C has been described, ALA in which two or more carbons are labeled with ¹³C can also be produced in the same manner. For example, [1,2-¹³C]ALA (1f) is synthesized from sodium [1,2-¹³C]acetate (2c) via ethyl [1,2-¹³C]bromoacetate (3c) by way of the compound (12).

Also, [4,5-¹³C]ALA (1g) is synthesized by synthesizing ethyl [1,2-¹³C]bromoacetate (3c) or [1,2-¹³C]glycine (9c) from the sodium [1,2-¹³C]acetate (2c) and via the compounds (7), (11) and (12).

In addition, [3,4,5-¹³C]ALA (1h) is synthesized from the [1,2-¹³C]phthalimidoacetyl chloride (7) and [2-¹³C]Meldrum's acid (10a) by way of the compounds (11) and (12).

Regarding derivatives of ALA labeled with ¹³C, there are various kinds and their typical examples include salts such as hydrochloride and sodium

salt, esters such as methyl ester, acid halides such as acid chloride and amides, which can be easily produced by known methods.

Next, Fig. 2 shows production steps of porphobilinogen (PBG) from ALA, showing synthesis examples of ^{13}C -labeled PBG in which two carbons are labeled with ^{13}C using the ALA obtained by the method shown in Fig. 1 in which one carbon is labeled with ^{13}C .

For example, as shown in Fig. 2, a PBG (20e) in which two of the 2-position carbon of the pyrrole ring and the carbon adjacent to the amino group are labeled with ^{13}C is obtained when [5- ^{13}C]ALA (1e) is condensed using an ALA dehydrogenase (ALA-D or PBG synthase).

Also, as shown in Fig. 2, a PBG (20c) in which two of the 4-position carbon of the pyrrole ring and the carbon binding to the 3-position of the pyrrole ring are labeled with ^{13}C is obtained when [3- ^{13}C]ALA (1c) is used instead of the [5- ^{13}C]ALA (1e).

In the same manner, by the use of an ALA (1a), (1b) or (1d) in which the carbon of other position is labeled with ^{13}C , a PBG in which the carbon of corresponding position is labeled with ^{13}C is obtained. In addition, a PBG in which 4 carbons are labeled with ^{13}C is obtained when an ALA in which 2 carbons are labeled with ^{13}C is used, and a PBG in which 6 carbons are labeled with ^{13}C is obtained when an ALA in which 3 carbons are labeled with ^{13}C is used.

The PBG produced in this manner is useful, e.g., as a therapeutic drug for lead poisoning.

[Examples]

The methods of the invention are illustratively described based on inventive and reference examples.

Example 1

An 847.7 mg (3.31 mmol) portion of ethylphthalimide acetoacetate (11) was dissolved in 7 ml of 1,2-dimethoxyethane, and this solution was added to a suspension of 7 ml of 1,2-dimethoxyethane and 154.0 mg (3.85 mmol) of sodium hydride (60% in paraffin) and stirred at room temperature for 1 hour in an atmosphere of argon. Thereafter, a solution obtained by dissolving 647 mg (3.85 mmol) of ethyl [1- ^{13}C]bromoacetate (3a) in 5 ml of dry

1,2-dimethoxyethane was added to this suspension and stirred at room temperature for 1 day, and the thus obtained reaction mixture was neutralized with 1 N hydrochloric acid and extracted with ether. The thus obtained organic phase was washed with saturated brine and dried with a drying agent, and then the solvent was evaporated to obtain 1.25 g (yield 89.7%) of [1-¹³C]ethyl 3-ethoxycarbonyl-5-phthalimidolevulinate (12a) as colorless needle crystals.

Results of the measurement of melting point, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR and MS of this product are shown below.

Melting point: 71-74°C

¹H-NMR (CDCl₃): 1.25 & 1.33, 2.95, 4.18 & 4.29, 4.19, 4.83, 7.83 ppm

¹³C-NMR (CDCl₃): 170.6 (1-¹³C) ppm

IR (KBr): 1723 cm⁻¹

MS (m/z): 362 (M⁺)

Next, the thus obtained diester (12a) was dissolved in 15 ml of glacial acetic acid-concentrated hydrochloric acid (1:1) mixed solution and heated under reflux for 1 day in an atmosphere of argon. After the reaction, solvent in the reaction mixture was evaporated, the thus obtained brown powder residue was dissolved in 20 ml of water and then excess hydrogen chloride was evaporated. The thus obtained residue was again dissolved in 40 ml of water and washed three times with 150 ml of ethyl acetate in order to remove phthalic acid. The thus obtained water phase was concentrated, and the residue was purified with an ion exchange resin, freeze-dried and then recrystallized from an ethanol/ether solvent to obtain 1.25 g (yield 71%) of [1-¹³C]5-aminolevulinic acid hydrochloride (1a) as colorless needle crystals.

Results of the measurement of melting point, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and IR of this product are shown below.

Melting point: 146-149°C

¹H-NMR (D₂O): 2.71, 2.90, 4.13 ppm

¹³C-NMR (D₂O): 177.4 (1-¹³C) ppm

IR (KBr): 3430 cm⁻¹

Example 2

A mixture of 1.0 g (13.1 mmol) of [1-¹³C]glycine (9a) (99% atom ¹³C) and 1.95 g (13.1 mmol) of phthalic anhydride was heated at 150 to 170°C for 10 minutes until it was melted and again solidified, and the thus formed product was recrystallized from water and dried to obtain 2.64 g (yield 97.5%) of [1-¹³C]phthalimidoacetic acid (6a) as colorless needle crystals.

Results of the measurement of melting point, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR and MS of this product are shown below.

Melting point: 191-194°C

¹H-NMR (acetone-d₆): 4.40, 7.82 ppm

¹³C-NMR (acetone-d₆): 168.93 (1-¹³C) ppm

IR (KBr): 1720, 1775 cm⁻¹

MS (m/z): 206 (M⁺)

A 2.64 g (12.8 mmol) of the thus obtained [1-¹³C]phthalimidoacetic acid (6a) was dissolved in 12 ml (61.8 mmol) of thionyl chloride and heated at 60°C under reflux for 4 hours, and then excess thionyl chloride was removed. The thus obtained light yellow solid was dissolved in benzene and then thionyl chloride was completely removed by evaporating benzene, thereby obtaining 2.91 g (yield 99.2%) of [1-¹³C]phthalimidoacetyl chloride (7a) as light yellow crystals. Results of the measurement of ¹H-NMR (CDCl₃) were 4.80, 7.78 ppm.

Next, 1.95 g (13.5 mmol) of Meldrum's acid (20) was dissolved in a mixed solvent of 1 ml dichloromethane and 2 ml pyridine, a 2 ml dichloromethane solution of 2.91 g (13.0 mmol) of the [1-¹³C]phthalimidoacetyl chloride (7a) was added dropwise to this solution at 0°C in an atmosphere of argon, spending 1.5 hours, and the mixture was allowed to undergo the reaction at room temperature for 1.5 hours while stirring. After completion of the reaction, the thus obtained reaction product was washed with 6 N hydrochloric acid and saturated brine and dried with a drying agent and then the solvent was evaporated. The thus obtained viscous oil was refluxed for 3 hours in 100 ml of anhydrous ethanol, and then excess ethanol was evaporated. The residue was diluted with 100 ml of dichloromethane, washed with saturated sodium bicarbonate aqueous solution and saturated brine and dried with a drying agent, the solvent was evaporated, and then the thus obtained crude product was

recrystallized from ethanol to obtain 2.33 g (yield 65.4%) of [3-¹³C]ethylphthalimide acetoacetate (11b) as colorless needle crystals.

Results of the measurement of melting point, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR and MS of this product are shown below.

Melting point: 109-111°C

¹H-NMR (CDCl₃): 1.29, 3.50, 4.22, 4.62, 7.77 ppm

¹³C-NMR (CDCl₃): 194.79 (3-¹³C) ppm

IR (KBr): 1722, 1745 cm⁻¹

MS (m/z): 276 (M⁺)

A 2.33 g (8.43 mmol) portion of the thus obtained [3-¹³C]ethylphthalimide acetoacetate (11b) was dissolved in 20 ml of 1,2-dimethoxyethane, the thus obtained solution was added to 5 ml of 1,2-dimethoxymethane suspension of 420.0 mg (10.5 mmol) sodium hydride (60% in paraffin) at 0°C under stirring, and then the mixture was stirred at room temperature for 1 hour in an atmosphere of argon. Next, 5 ml of 1,2-dimethoxyethane solution of 1.76 g (10.5 mmol) ethyl bromoacetate (3) was added to the thus obtained suspension and allowed to undergo the reaction at room temperature for 2 days under stirring. After completion of the reaction, the thus obtained reaction mixture was neutralized with 1 N hydrochloric acid and extracted with ether, the orange ether layer was washed with saturated brine and dried with a drying agent, and then the solvent was evaporated to obtain [4-¹³C]ethyl 3-ethoxycarbonyl-5-phthalimidolevulinate (12d) as a crude product. This crude product (12d) was used directly in the subsequent reaction without purification.

This crude product (12d) was dissolved in 20 ml of glacial acetic acid-concentrated hydrochloric acid (1:1) mixed solution and heated under reflux at 120°C overnight in an atmosphere of argon. After completion of the reaction, solvent in the reaction mixture was evaporated, the thus obtained brown residue was dissolved in 50 ml of water and then washed three times with 150 ml of ethyl acetate in order to remove phthalic acid. The thus obtained water layer was concentrated, and the residue was purified using an ion exchange resin, freeze-dried and then recrystallized from an ethanol/ether

solvent to obtain 391.0 mg (yield 27.5%) of [4-¹³C]5-aminolevulinic acid hydrochloride (1d) as colorless needle crystals.

Results of the measurement of melting point, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and IR of this product are shown below.

Melting point: 146-149°C

¹H-NMR (D₂O): 2.71, 2.90, 4.13 ppm

¹³C-NMR (D₂O): 206.3 (1-¹³C) ppm

IR (KBr): 3430 cm⁻¹

Example 3

A 0.58 g (5.4 mmol) portion of sodium carbonate was added to 1.5 ml aqueous solution of 1.473 g (10.6 mmol) [2-¹³C]bromoacetic acid (2b), 1.5 ml aqueous solution of 0.60 g (12.3 mmol) sodium cyanate was added dropwise thereto under ice-cooling, and then the reaction was carried out in a boiling bath for 40 minutes. Thereafter, this was once returned to room temperature, mixed with 0.5 g of sodium hydroxide and then heated in a boiling bath for 2 hours. Next, this solution was mixed with an aqueous solution of 0.8 g calcium chloride and allowed to undergo the reaction at room temperature for 2 days. After completion of the reaction, the product was collected by filtration, washed with water, dried, mixed with ether, further mixed with 1.0 ml of 12 N hydrochloric acid and then extracted with ether. The thus obtained ether layer was dried and then the solvent was evaporated to obtain 0.444 g (yield 40.3%) of [2-¹³C]malonic acid as a crude product.

Next, the [2-¹³C]malonic acid was suspended in a mixed solution of 0.5 ml acetic anhydride and 0.05 ml concentrated sulfuric acid, 0.4 ml of anhydrous acetone was added dropwise thereto under ice-cooling, and then the reaction was carried out at room temperature for 1 hour. After completion of the reaction, the precipitated crystals were collected by filtration, and the thus obtained crude crystals were washed with 2 ml of 0.5 N sulfuric acid, washed with water and then recrystallized from an acetone/ether/n-hexane mixed solvent to obtain 0.311 g (yield 50.6%) of [2-¹³C]Meldrum's acid (10a) as colorless needle crystals.

Results of the measurement of melting point, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and IR of this product are shown below.

Melting point: 92-95°C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 3.62, 1.79 ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 36.15 ($2\text{-}^{13}\text{C}$) ppm

IR (KBr): 1790, 1750 cm^{-1}

Next, using the [$2\text{-}^{13}\text{C}$]Meldrum's acid (10a), [$3\text{-}^{13}\text{C}$]ALA-HCl was synthesized in the same manner as the case of [$1\text{-}^{13}\text{C}$]ALA-HCl (1a).

Melting point, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, IR and MS of the intermediates and [$3\text{-}^{13}\text{C}$]ALA-HCl were measured. The results are shown below.

[$2\text{-}^{13}\text{C}$]Ethylphthalimide acetoacetate (11a):

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1.31, 3.58, 4.24, 4.76, 7.88 & 7.75 ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 46.90 ($2\text{-}^{13}\text{C}$) ppm

[$3\text{-}^{13}\text{C}$]Ethyl 3-ethoxycarbonyl-5-phthalimidolevulinate (12c):

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1.26, 1.35, 2.94, 3.02, 4.15, 4.16, 4.28, 4.73, 4.94, 7.88 ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 52.05 ($3\text{-}^{13}\text{C}$) ppm

[$3\text{-}^{13}\text{C}$]ALA-HCl (1c) (yield 1.285 g, yield from the compound (10a) 27.3%):

Melting point: 147°C

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): 2.70, 2.89, 2.89, 4.12 ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): 36.8 ($3\text{-}^{13}\text{C}$) ppm

IR (KBr): 3430 cm^{-1}

Example 4

[$5\text{-}^{13}\text{C}$]ALA-HCl was obtained in the same manner as in Example 2, except that [$2\text{-}^{13}\text{C}$]glycine was used. The $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O) value of this product was 47.8 ppm.

Also, [$2\text{-}^{13}\text{C}$]ALA-HCl (1b) was obtained in the same manner as in Example 1, except that ethyl [$2\text{-}^{13}\text{C}$]bromoacetate (3b) was used. Melting point of this product was 148°C, its $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O) value was 31.6 ppm and its IR (KBr) value was 3430 cm^{-1} .

Reference Example 1: Synthesis of ethyl [2-¹³C]bromoacetate (3b)

A 1.1 g (9.0 mmol) portion of benzoic acid and 820 mg (10 mmol) of sodium [2-¹³C]acetate (2b) were put into a round bottom flask, further mixed with 7.5 ml (64 mmol) of benzoyl bromide, and then the reaction was carried out at 120°C for 5 hours. The thus formed acetyl bromide was distilled into a receiver, and 2.6 ml (50 mmol) of dry bromine was introduced into this receiver at -78°C for 5 minutes. After completion of the bromine introduction, the reaction mixture was stirred at room temperature for several minutes and then refluxed for 5 hours. After cooling the reaction mixture to room temperature, excess bromine was removed by nitrogen gas blow, 2.4 ml (40 mmol) of dry ethanol was added at -78 spending 10 minutes and then the reaction was carried out at room temperature for 12 hours under stirring. The reaction product was neutralized with 10 ml of saturated sodium bicarbonate aqueous solution and extracted three times with 30 ml of ether, the thus obtained ether layer (90 ml) was washed twice with 10 ml of water and dried using a drying agent, and then ether was evaporated to obtain 991 mg (yield 59.3%) of ethyl [2-¹³C]bromoacetate (3b) as a light yellow oil.

¹H-NMR, ¹³C-NMR and IR of this product were measured. The results are shown below.

¹H-NMR (CDCl₃): 1.35, 3.15, 4.20 ppm

¹³C-NMR (CDCl₃): 25.9 (2-¹³C) ppm

IR (KBr): 1735 cm⁻¹

Reference Example 2: Synthesis of ethyl [1-¹³C]bromoacetate (3a)

Using sodium [1-¹³C]acetate (2a), this was prepared in the same manner as in Reference Example 1. ¹H-NMR, ¹³C-NMR and IR of the thus obtained ethyl [1-¹³C]bromoacetate (3a) were measured. The results are shown below.

¹H-NMR (CDCl₃): 1.35, 3.77, 4.20 ppm

¹³C-NMR (CDCl₃): 167.2 (1-¹³C) ppm

IR (KBr): 1735 cm⁻¹

Reference Example 3: Synthesis of [2-¹³C]ethyl phthalimidoacetate (5b)

A 939 mg (5.59 mmol) portion of ethyl [2-¹³C]bromoacetate (3b) was allowed to react with 1.15 g (6.22 mmol) of potassium phthalimide (4) in 7.6 ml of dimethylformamide under reflux for 3 hours, the thus obtained reaction mixture was extracted four times with 15 ml of chloroform, the chloroform layer (60 ml) was neutralized with 10 ml of 0.1 N sodium hydroxide solution, washed twice with 15 ml of water and dried using a drying agent, the solvent was evaporated and then the thus obtained crude product was recrystallized from ethanol to obtain 975 mg (yield 75.0%) of [2-¹³C]ethyl phthalimidoacetate (5b) as colorless needle crystals. ¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR and MS of the thus obtained [2-¹³C]ethyl phthalimidoacetate (5b) were measured. The results are shown below.

¹H-NMR (CDCl₃): 1.25, 3.72, 4.29, 7.78 ppm

¹³C-NMR (CDCl₃): 38.98 (2-¹³C) ppm

IR (KBr): 1776, 1732, 1720 cm⁻¹

MS (m/z): 234 (M⁺)

Reference Example 4: Synthesis of [2-¹³C]glycine (9b)

A 250 mg (1.07 mmol) portion of the [2-¹³C]ethyl phthalimidoacetate (5b) obtained in Reference Example 3 was dissolved in 6.25 ml of 6 N hydrochloric acid and allowed to undergo the reaction under reflux for 5 hours. The reaction mixture was diluted with the same volume of water and washed three times with 10 ml of ethyl acetate, the solvent was evaporated and then the thus obtained residue was purified by an ion exchange resin to obtain 108 mg (yield 90.0%) of [2-¹³C]glycine (9b) as white powder. ¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR and MS of the thus obtained [2-¹³C]glycine (9b) were measured. The results are shown below.

¹H-NMR (D₂O): 3.79 ppm

¹³C-NMR (D₂O): 49.93 (s, ¹³C) ppm

IR (KBr): 3100, 1600 cm⁻¹

MS (m/z): 76 (M⁺)

Example 5

A 0.1 ml portion of a solution prepared by dissolving ^{13}C -labeled ALA in heavy water containing dioxane as the internal standard was put into a 5 mm NMR tube, 0.05 ml of 0.5 M sodium phosphate buffer and the same volume of zinc sulfate (1 mM)-dithiothreitol (100 mM) were added to the ^{13}C -labeled ALA solution, 0.3 ml of 5-aminolevulinate dehydrogenase was further added thereto and rapidly stirred, and then the mixture was cultured to carry out the enzyme reaction.

The 5-aminolevulinate dehydrogenase used herein was isolated from human peripheral blood, and the enzyme had a specific activity of 12.6 units/mg when analyzed by the Granick Hauzerall method.

In this enzyme reaction, proton decoupling ^{13}C -NMR spectra in the sodium phosphate buffer (pH 6.8) in 5 mm NMR tube were measured at 100.4 MHz using JOEL-GX-400 spectrometer. These spectra were measured at 20°C using a pulse width of 5.5 μs (45° pulse) and a spectrum width of 25,000 Hz. The internal lock of heavy water was used, and the chemical shift was measured using dioxane (67.4 ppm) as the internal standard.

When [5- ^{13}C]ALA (1e) is used as the ^{13}C -labeled ALA, the PBG (20e) in which the 2-position carbon of the pyrrole ring and two carbons adjacent to the amino group are labeled with ^{13}C is formed. As shown in Figs. 2A and 2B, this was confirmed by the periodical decrease in the signal ($\delta = 47.8$ ppm) of [5- ^{13}C]ALA and the accompanying increase in two signals ($\delta = 35.5$ ppm and $\delta = 117.2$ ppm) belonging to PBG. Also, it was confirmed that the PBG (20c) in which two of the 3-position carbon of the pyrrole ring and the carbon binding to the 4-position of the pyrrole ring are labeled with ^{13}C is formed when [3- ^{13}C]ALA (1c) is used, in the same manner by the periodical changes in signals shown in Figs. 3A and (3B).

[Effects of the invention]

According to the invention, 5-aminolevulinic acid in which at least one optional position of 5-aminolevulinic acid is labeled with ^{13}C , or a derivative thereof, can be produced using sodium acetate labeled with ^{13}C at the 1- and/or 2-position as the starting material, and various types of porphobilinogen in which at least two carbons are labeled with ^{13}C can be produced using the ^{13}C -labeled 5-aminolevulinic acid.

4. Brief Description of the Drawings

Fig. 1 is a chart showing a synthetic pathway for synthesizing 5-aminolevulinic acid in which an optional position is labeled with ^{13}C from sodium acetate labeled with ^{13}C at the 1- and/or 2-position, Figs. 2A and 2B are a chart showing a synthetic pathway for synthesizing ^{13}C -labeled porphobilinogen from $[5-^{13}\text{C}]5$ -aminolevulinic acid and a ^{13}C -NMR spectrum showing periodical changes during the process, and Figs. 3A and 3B are a chart showing a synthetic pathway for synthesizing ^{13}C -labeled porphobilinogen from $[3-^{13}\text{C}]5$ -aminolevulinic acid and a ^{13}C -NMR spectrum showing periodical changes during the process.

FIG. 2
(a)

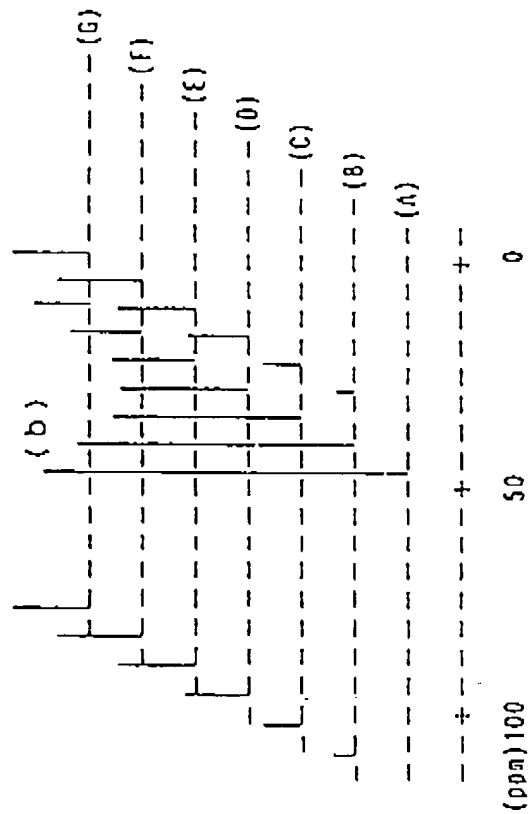
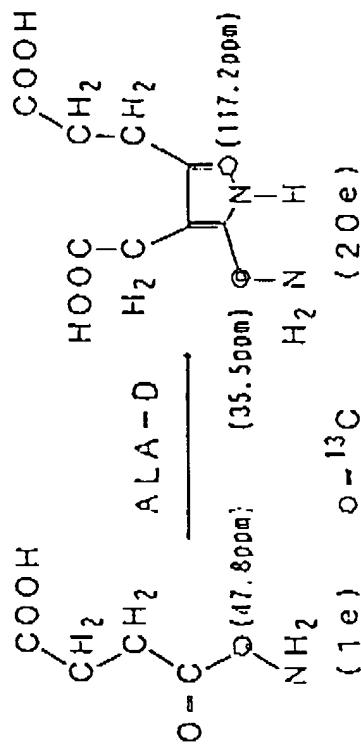


FIG. 3
(a)

